

KRYOSPERMA

Herstellung, Lagerung, Indikation, Therapie
Eine kritische Literaturübersicht

von

Odd Aga

aus

Roedøey/Norwegen



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546211_0036

Aus der Frauenklinik mit Poliklinik und Hebammenschule

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. K. G. Ober

KRYOSPERMA

Herstellung, Lagerung, Indikation, Therapie

Eine kritische Literaturübersicht

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Odd Aga

aus

Roedoe/Norwegen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. Dr. K.-G. Bregulla
Korreferent: Prof. Dr. K.-G. Ober
Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.1980

INHALTSVERZEICHNIS

I.	<u>EINLEITUNG</u>	<u>Seite</u>
	a) Bedeutung der Kryokonservierung menschlicher Keimzellen	1
	b) Geschichte der Kryokonservierung	2
II.	<u>HAUPTTEIL</u>	
	a) Herstellung des Kryosperma	3
	aa) Nativsperma	4
	ab) Verflüssigung	7
	ac) Verdünnung	7
	ad) Verpackung	10
	ae) Adaptationszeit	13
	af) Einfrieren	13
	ag) Lagerung	15
	ah) Auftauen	17
	b) Indikation und Therapie	18
III.	<u>DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG</u>	20
IV.	<u>ABBILDUNGEN</u>	24
V.	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	
VI.	<u>BIOGRAPHISCHE DATEN</u>	

Bedeutung der Kryokonservierung

Menschliche Keimzellen durch Kälte zu konservieren, kann aus verschiedenen Gründen sinnvoll sein. In den vergangenen 30 Jahren wurde fast ausschließlich die Kryokonservierung der Samenzellen versucht. Erst seit wenigen Jahren gewinnt auch dieses Verfahren für eine langfristige Lagerung menschlicher Eizellen eine größere Bedeutung.

STEPTOE und EDWARDS gelang 1978 ein großartiger Erfolg bei der Behandlung einer sterilen Ehe. Ursache der Sterilität waren unpassierbare Eileiter. Nach der Punktion einer menschlichen Eizelle aus dem Ovar, ihrer extrakorporalen Reifung und Befruchtung konnten sie den jungen Embryo im Morulastadium auf ein nidationsfähiges Endometrium implantieren. Die Schwangerschaft verlief komplikationslos. Es besteht also gar kein Zweifel darüber, daß Manipulationen mit menschlichen Keimzellen bei bestimmten Gegebenheiten äußerst hilfreich sein können. Bei den eingeschränkten Möglichkeiten menschliche Keimzellen zu gewinnen und bei ihrer stark begrenzten Lebens- und Befruchtungsfähigkeit werden Verfahren, etwa die Kryokonservierung, welche die Steuerung verschiedener Prozesse begünstigen, eine entscheidende Rolle spielen. Damit erreicht die Gefrierkonservierung menschlicher Keimzellen eine neue Dimension und fordert gleichzeitig zu einer Bilanz der vergangenen Jahre. Sie ist, soweit es die menschlichen Eizellen betrifft, schnell zu erstellen. Es wurden bisher nur Tastversuche gemacht (BURKS, DAVIS, BAKKEN, THOMASOVIC und BREGULLA). Ein brauchbares, standardisiertes Verfahren mit guten Ergebnissen existiert noch nicht.

Geschichte der Kryokonservierung

Am Anfang der Geschichte des Kryospermas steht eine zufällige Entdeckung. 1776 fand SPALLANZANI an Soldaten, die im Winter gefallen waren, noch kurze Zeit nach ihrem Tod lebende Spermien. Er verband dieses Ereignis mit dem Kältemedium Schnee und animierte damit 1866 MANTEGAZZA zu den ersten Überlegungen für eine Spermaabank. Bis JAHNEL 1938 die Erkenntnis SPALLANZANIS bestätigte, gab es für die Gefrierkonservierung des Samens keine Neuerungen. JAHNEL konnte am eingefrorenen und mit Spirochäten infizierten Kaninchenhoden bei einer Lagerungsdauer bis zu 40 Tagen, bei einer Temperatur von -79°C , noch lebende Spermien nach dem Auftauen der Präparate erkennen. Den großen Durchbruch bei der Gefrierkonservierung von Keimzellen brachten die Gefrierschutzstoffe. Letztlich ist die Wirkung dieser protektiven Substanzen auch bis heute noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Man nimmt aber bei einer intra- und extrazellulären Wirkung eine Veränderung der Kristallisationsvorgänge an. Dadurch überlebt ein grosser Teil der Keimzellen ohne Schaden.

Von diesen Schutzstoffen wurde zuerst das Glycerin benutzt. PARKES und ROSTAND nahmen es für die Konservierung von Froscheiern. POLGE, SMITH und PARKES benutzten es dann 1949 für die Kryokonservierung des menschlichen Samens. Erst damit ließen sich annehmbare Überlebensraten für die Samenfäden bei der Gefrierung erreichen.

Die Möglichkeit, Samenzellen durch Kälte zu konservieren, wurde in der Humanmedizin 1952 von BUNGE und SHERMAN genutzt. Kryosperma, das mit Glycerin als protektiver Substanz hergestellt und bei -79°C gelagert wurde, konnte von ihnen erfolgreich für die Insemination benutzt werden. SHERMAN nahm dann später, ab 1963 flüssigen Stickstoff als Lagermedium. Die Senkung der Lagertemperatur von -79°C auf -196°C brachte eine weitere Minderung der Stoffwechselvorgänge in der abgekühlten, lebenden Zelle. Mit dem so behandelten Sperma erreichten 1964 SMITH, STEINBERGER und PERLOFF nach Inseminationen Graviditäten bei der Behandlung steriler Partnerschaften. Alle in den nachfolgenden Jahren bis 1978 erschienenen Publikationen enthielten Variationen für die technische Aufarbeitung des Kryospermis. Grundsätzliche Änderungen gab es also in dieser Zeit nicht, nur der technische Vorgang wurde in den entscheidenden Phasen entweder differenzierter oder einfacher.

HERSTELLUNG DES KRYOSPERMAS

Für die Aufarbeitung des Ejakulates zum Kryosperma sind einige typische Arbeitsgänge notwendig. Die einzelnen Phasen dieser Aufarbeitung sind in Abb.1 dargestellt. Dabei ist der Ablauf der Herstellung durch die Pfeilrichtung markiert. Den einzelnen Arbeitsphasen sind die jeweils bekannten Variablen, die die Qualität des Kryospermis beeinflussen können, zugeordnet.

GEWINNUNG DES NATIVSPERMAS

Die Qualität des Kryospermas wird unabhängig von den einzelnen Phasen des Gefrierprozesses entscheidend durch das Ausgangsmaterial bestimmt. Ejakulate, welche die Andrologen mit ihren Kriterien als gut und fertil beschreiben, eignen sich meist auch für die Kryokonservierung. Es gibt aber auch Samen mit ausgezeichneten Nativspermaeigenschaften, der sich für die Kryokonservierung nicht eignet. So kann man im Einzelfall durchaus von guten und schlechten "Einfrierern" sprechen. Gelegentlich sieht man auch bei der Aufarbeitung mehrerer Ejakulate des gleichen Samens sehr unterschiedliche Reaktionen des Samens auf gleichbleibende Einfrier- und Auftaubedingungen (BREGULLA).

Die Karenzzeiten bis zur Abgabe des Ejakulates sollten nach BECK und SILVERSTEIN nicht weniger als 48 Stunden betragen. Zu kurze Zeitabstände haben geringere Spermatozoenkonzentrationen mit vermehrt unreifen Formen zur Folge. Bei Karenzzeiten von mehr als 14 Tagen fallen zunehmend pathologische Formen der Samenfäden auf (ELIASSON).

Zur Gewinnung des Ejakulates wird in der Literatur am häufigsten die Masturbation in der Klinik kurz vor der Insemination oder dem Einfrieren des Samens empfohlen. Das Ejakulat soll in trockene, saubere und verschließbare Glasgefäße, die eine Verdunstung verhindern, eingefüllt werden. Ob in einem so unglücklich physisch und psychisch sterilen "Milieu" produzierte Ejakulate qualitativ hochwertig sind,

wird bezweifelt, und als günstigere Voraussetzung eine maximale sexuelle Stimulierung angenommen (BREGULLA).

Werden Ejakulate mit dem Ziel einer heterologen Insemination kryokonserviert, so fordern die meisten Untersucher Qualitätsmerkmale die man auch sonst einem guten, fertilen Ejakulat zuordnet (ELIASSON). Die Anzahl der Samenzellen pro Milliliter beträgt danach 40-200 Millionen. (BARKAY, BECK, BOSTRÖM, FRIBERG, GEMZELL, MATHESON, RUBIN, SAWADA, SMITH, STEINBERGER). Für die Motilität werden von den gleichen Autoren Werte über 50 % gefordert. FRIBERG und GEMZELL beschreiben zusätzlich noch die Bedeutung der abnormen Zellen. Ihr Anteil sollte 30 % nicht überschreiten. Auf die Funktion der Spermienpenetration im Cervikalschleim in vitro weisen FJÄLLBRANT und MATHESON hin. Sie halten diese Untersuchung für aufschlußreich und verlangen eine Penetrationstiefe von mindestens 2 mm in 5 Minuten.

Trotz geringer unterschiedlicher Angaben der einzelnen Autoren ist die Tendenz doch eindeutig. Nur qualitativ guter Samen sollte für die Kryokonservierung ausgewählt werden. Soweit er für die heterologe Insemination genutzt wird, wäre noch die Keimfreiheit von pathologischen Erregern, ein genetisch gesunder Samen und Kenntnis bestimmter Erbmerkmale, etwa Blutgruppe und Rasse, wichtig. Daß die Kriterien für die oligozoospermen Ejakulate nur bedingt zutreffen, und auch hier die Kryokonservierung durchaus eine Indikation haben kann, wird später noch beschrieben.

Für das normo- und das oligozoosperme Ejakulat besteht die Möglichkeit der Samenzellanreicherung durch die SPLIT-Technik. BROESIKE beschrieb 1911 als erster die inhomogene Zusammensetzung des Ejakulates. In einem dreigeteilten Ejakulat befindet sich meist die größte Samenzellkonzentration in der mittleren Fraktion. Bei einem zweigeteilten Ejakulat enthält die erste Portion die meisten Samenzellen. AMELAR und HOTCHKISS, HARVEY und JACKSON und MAC LEOD bestätigen das. Nach ihren Untersuchungen waren etwa 3/4 der Spermatozoen in der ersten Hälfte des Ejakulates vorhanden. Weitere Unterschiede wurden für die Viskosität des Ejakulates und die Morphologie der Samenfäden angegeben. Gelegentlich sind die Konzentrationsverhältnisse aber genau umgekehrt. HARVEY und AMELAR fanden das bei 6 % der untersuchten Ejakulate. LINDHOLMER und ELIASSON beobachteten die Motilität der Spermien in den einzelnen Samenfraktionen. Sie war in der spermienreichen ersten Fraktion wesentlich günstiger als in der zweiten spermienarmen, konnte von ihnen aber durch Zugabe von Humanalbumin an die erste Fraktion wieder angeglichen werden.

Eine andere Anreicherung der Samenfäden hat BUNGE 1954 beschrieben. Bei + 4°C ließ er den Samen eine Stunde stehen und dekantierte dann weitgehend das Samenplasma. Der Bodensatz bestand vorwiegend aus zellulären Elementen. Auch die Zentrifugation wurde für eine Anreicherung genutzt. BODENSTEIN gab dafür als günstigere Werte 500 - 1500 rpm an.

VERFLÜSSIGUNG

Ejakulate verändern sich in ihrer Konsistenz nach der Ejakulation. Der Samen ist zwar flüssig, wird dann in der Konsistenz fester, gelartig, um sich danach wieder zu verflüssigen. Diese Vorgänge laufen meistens innerhalb von 20 Minuten ab. Seltener sind Verflüssigungszeiten von mehr als 1 Stunde. Die Verflüssigung sollte vor der Aufarbeitung des Ejakulates als Kryosperma erreicht sein.

VERDÜNNUNG

Die Einfrierung des unbehandelten Samens unter verschiedenen Temperatur- und Zeitbedingungen ergibt ohne Zusatz eines Schutzstoffes kein brauchbares Kryosperma. Man muß, um Gefrierschäden an den Samenfäden zu verhüten, protektive Substanzen hinzufügen. Das zuerst benutzte protektive Medium für die Keimzellkonservierung war das Glycerin. Es hat sich in den vergangenen Jahren als beste protektive Substanz bewährt. Andere Schutzstoffe waren in ihrer Wirkung weniger günstig.

In der Literatur sind Verdünner von BEHRMAN und SAWADA, MATHESON, GEMZELL und CARLBORG und von VASTERLING für das Humansperma beschrieben. Alle Autoren haben sich an den Erkenntnissen der Veterinärmediziner, die in allen Bereichen der Experimente mit Keimzellen Schrittmacher für die Entwicklung in der Humanmedizin waren, orientiert.

Die heute für das menschliche Sperma benutzten Verdünner haben folgende Zusammensetzung:

Zusammensetzung von je 1.000 ml Medium:

Medium von BEHRMAN-SAWADA

200 ml	Eigelb
140 ml	Glycerin
264 ml	Glukose 5%ig
396 ml	Natriumcitrat 2,9%ig
1 Mill.i.E.	Penicillin G
0,5 g	Streptomycin
20 g	Glykokoll

Nach dem Ansetzen des Mediums wird es inaktiviert durch Erwärmen auf 56°C für 30 Minuten. Der ph-Wert wird danach auf 7,2-7,4 mit Natriumbicarbonat eingestellt. Bei Bedarf von mehr als 0,05 Volumenprozent einer 1,3 %igen Natriumbicarbonatlösung sollte die Pufferung mit einer 0,1 n Natronlauge erfolgen.

Medium nach NAGASE

845 ml	Zuckerlösung (Ansatz 1000 ml: 18 g Glukose, 44 g Laktose, 54 g Raffinose gelöst in 1000 ml aqua dest)
100 ml	Eigelb
55 ml	Glycerin

Medium nach CARLBORG

200 ml	Eigelb
150 ml	Glycerin
260 ml	Glukose 5,5%ig
390 ml	Natriumcitrat 3%ig
1 g	Erythromycin

Vergleicht man die Anzahl der Gefriermedien mit denen in der Veterinärmedizin, so ist ihre Zahl für das menschliche Kryosperma sehr klein. Das läßt sich wahrscheinlich durch die geringe Anzahl von experimentellen Untersuchungen, die auf diesem Gebiet geführt wurden, erklären. Zumindest hat SHERMAN durch Zusatz verschiedener Eigelbkonzentrationen zum protektiven Medium keinen wesentlichen Einfluß auf die Überlebensraten erkennen können. RUBIN und ANDERSSON bestätigten das später, betonten aber den positiven Effekt einer Zugabe von Humanalbumin. FRIBERG und GEMZELL überprüften diese Erkenntnisse bei der Behandlung steriler Partnerschaften. Nach der Insemination waren im Kollektiv die erreichten Schwangerschaften in der Anzahl gleich groß, unabhängig von der alleinigen Glycerinzugabe oder der Kombination von Glycerin und Eidotter im Medium.

Außer Glycerin sind auch Dimethylsulfoxyd (DMSO) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) auf ihre protektive Wirkung von MAHNER untersucht worden. Dimethylsulfoxyd war bei dieser Versuchsanordnung ungünstiger als Glycerin und das Polyvinylpyrrolidon schlechter als das Dimethylsulfoxyd.

Die große Zahl der Variablen beim Einfrierprozeß und das kleine Volumen jedes spezifisch reagierenden Ejakulates beim Einfrieren zeigen die Unmöglichkeit einer korrekten und reproduzierbaren Untersuchung. So werden aus der Vielzahl von Variablen nur wenige

geprüft werden können. Das dürfte das zentrale Problem der Human-Kryosperma-Forschung sein. Dies trifft für alle Arbeitsgänge dieser Methode zu.

Soweit sich bei diesen Gegebenheiten der Wert der angegebenen Verdünner prüfen läßt, hat HARPANTIDOU das in einer vergleichenden Studie getan. Danach ist bei der Aufarbeitung des Kryospermas als Pellet das Nagase-Medium dem Verdünner von BEHRMAN, SAWADA und von CARLBORG überlegen. Das günstigste Verhältnis des Samens zum Verdünner betrug 1:1. (Abb.2)

VERPACKUNG

Die einzufrierenden Samenportionen können in Ampullen, Pailletten oder als Pellets abgefüllt, eingefroren, gelagert, und aufgetaut werden.

Die Ampullen wurden zuerst benutzt (BEHRMAN, SHERMAN). Ihr Fassungsvermögen lag am häufigsten zwischen 0,7 und 1 ml. Für das Abfüllen des verdünnten Samens in die Glasampullen und für ihren Verschuß ist ein erheblicher technischer und damit auch finanzieller Aufwand notwendig. Gelegentlich lassen sich beim Zuschweißen der Glasampullen kapillare Spalten nicht vermeiden. Durch sie dringt beim Einfrieren und Lagern Stickstoff in die Ampullen ein. Beim Auftauen kommt es dann durch erhebliche Drucksteigerungen in der Ampulle zu explosionsartigen Zerreißen. Glassplitterverletzungen können die Folge sein.

Eine imponierende Vereinfachung für die Gefrierung von Bullensperma hat als erster CASSOU mit dem Gebrauch der Kunststoffpailletten beschrieben. Nachdem das Verfahren in der Veterinärmedizin seit einem Jahrzehnt etabliert war, wurde es auch von FRIBERG, GEMZELL und CARLBORG, allerdings in Zusammenhang mit einem von ihnen entwickelten Verdünnern, in die Humanmedizin übernommen. Das Volumen der industriell hergestellten Pailletten beträgt 0,25, 0,5 und 1 ml. Für die Gefrierkonservierung des menschlichen Samens haben sich die Pailletten mit einem Volumen von 0,5 ml am besten bewährt (Abb.3).

Als Pellet wird die Gefrierung des Samens in Form eines Tropfens, also etwa eines kugelförmigen Gebildes angegeben. Das Pellet kann dabei ohne isolierende Schutzhülle als Nacktpellet oder von einer Hülle umgeben, als Kapselpellet eingefroren werden. Die Größe der Pellets wird vorwiegend von der Samenzellkonzentration und der Inseminationsart bestimmt. Die Qualität des Samenpellets ist kaum vom Pelletvolumen abhängig, soweit 1 ml als Volumen nicht überschritten wird (APLAS). Für den Bereich zwischen 0,1 und 0,2 ml zeigt das Abb. 4.

Mit dem Problem der Verpackung ist das der Identitätsgarantie gekoppelt. Möglich wird diese durch die Abpackung in Ampullen und Pailletten, die durch farbige Markierung und Beschriftung eine Verwechslung ausschließen. Für Pellets läßt sich das aber nur erreichen, wenn die einzelnen Pellets entweder in markierten Kapseln eingeschlossen oder in entsprechenden Behältern gelagert werden. Bei direktem Kontakt verschiedener Samenpellets in flüssigem Stickstoff

entsteht Abriebsperma. Ganze Samenfäden oder Zellfragmente werden von einzelnen Pellets durch Erschütterungen, die den Lagercontainer treffen, abgelöst. Die Anzahl der Abriebspermien ist eindeutig abhängig von dem Umfang der Abriebskräfte.

RUDOFISKY hat das bewiesen (Abb.5).

Das auf dem gleichen Wege Infektionen übertragen werden können, ist gesichert. JAHNEL hat das 1940 für Spirochäten bereits indirekt dargestellt, PIASECKA - SERAFIN taten dies 1970 für Colibakterien und SHERMAN und ROSENFELD 1975 indirekt wieder für die Gonokokkeninfektion.

Der Ausschluß einer bakteriellen Infektion des Samens durch eine kulturelle Untersuchung und die abriebssichere Verpackung und Lagerung wären Forderungen, die unabhängig davon erfüllt werden sollten, ob die Ejakulate zur homologen oder heterologen Insemination später benutzt werden.

Bei einem Vergleich der Samenqualität, abhängig von den verschiedenen Verpackungsarten, haben sich Unterschiede nachweisen lassen (APLAS, HUPFELD, RUDOFISKY). Danach ließe sich folgende Reihenfolge nennen:

1. Glasampulle 0,7 ml. Pellet 0,12 ml, Paillette 0,1 ml.
2. Paillette 0,5 ml, Paillette 0,25 ml.
3. Paillette 1,0 ml.

Berücksichtigt man bei einer solchen Aufzählung aber die geringen Qualitätsunterschiede, so haben verschiedene Probleme bei der Kryospermaherstellung eine viel stärkere Bedeutung und man favorisiert in der Praxis die Paillette mit 0,5 ml. Soweit mit Samenpellets gearbeitet wird, bleibt die Er-

kenntnis, daß die Portionierung zumindest in einem Bereich zwischen 0,1 und 1 ml sehr großzügig gewählt werden kann.

ADAPTATIONSZEIT

Als Adaptationszeit- oder Equilibrierungszeit wird die Zeit verstanden, die das protektive Medium braucht, um seine volle intra- und extrazelluläre Wirkung zu entfalten. SHERMAN hat 1963 bereits 25 sec. als ausreichende Adaptationszeit angegeben. Für eine ebenso kurze Zeit sprach sich FERNANDEZ-CANO und Mitarbeiter aus, da sie nach dem Zutropfen des protektiven Mediums ohne eigentliche Adaptationszeit die besten Ergebnisse sahen. Eine längere Adaptationszeit, etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur gab DAVID an. RUDOFISKY hat dazu exakte Untersuchungen vorgelegt. Danach waren Adaptationszeiten bis zu 30 Minuten bei + 5° C günstig. Länger dauernde Adaptationszeiten gingen mit einer kontinuierlichen Qualitätsminderung einher (Abb.6)

EINFRIEREN

Zum Thema der Gefrierkonservierung des menschlichen Samens konkurrieren in einer Literaturübersicht zwei Verfahren miteinander. Diese Verfahren sind die schnelle und die langsame Abkühlung und Gefrierung der einzelnen Samenportionen. SHERMAN hat 1963 zuerst das schnelle Abkühlen mit folgenden Abkühlphasen angegeben:
von Raumtemperatur auf 0 Grad C, eine Abkühlrate von 6° C/min. Danach wurde die Probe in Stick-

stoffdampf bei -75°C eingelagert, nach Erreichen dieser Temperatur in flüssigen Stickstoff bei -196°C umgesetzt und gelagert.

Die langsame Gefrierung haben BEHRMAN und SAWADA 1966 mitgeteilt:

von Raumtemperatur auf $+2^{\circ}\text{C}$ wurde um $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ abgekühlt, bis $-20^{\circ}\text{C}/5-7^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ und bis $-80^{\circ}\text{C}/10^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ Danach wurden die eingefrorenen Samenportionen in einen Container mit flüssigem Stickstoff eingetaucht.

Alle danach entwickelten Gefriertechniken basieren auf diesen Konzepten und sind lediglich Variationen. Von ihnen haben sich die Verfahren des Einfrierens in temperaturkonstanten Stickstoffdampfphasen zwischen -80 und -160°C am besten bewährt, wenn man den technischen Aufwand im Verhältnis zur Qualität des Kryospermas sieht (BOQUOI). Selbstverständlich sind Einfrieranlagen, mit denen zeit- und temperaturabhängige Vorgänge genau gesteuert werden können, wertvoll. Mit einfacheren und wesentlich billigeren Geräten lassen sich aber auch durchaus brauchbare Gefrierergebnisse erreichen. Die gefüllten Pailletten, die in einer einfachen Styroporschale in einer Stickstoffdampfphase gefroren werden und die Samenpellets, die auf einer Kohlensäureschnellplatte gefrieren, sind dafür Beispiele. Gelegentlich sind sogar komplizierte Apparaturen zur Herstellung des Kryospermas einfachen Methoden unterlegen. Eine vergleichende Untersuchung für die Pellets, hergestellt auf Trockeneisplatten oder Platten, die mit einem entsprechend aufwendigem Gerät durch Stickstoff gekühlt wurden (BARKEY) hat das gezeigt (EMRAN), (Abb.7-10).

FERNANDEZ-CANO hat bereits 1964 beim Vergleich zwischen schnellem und langsamem Einfrieren keine Qualitätsunterschiede nachweisen können. Auch das Einfrieren erst 4 Stunden nach der Samengewinnung blieb ohne Einbuße der Motilität. Dies steht im Gegensatz zur Forderung von BEHRMAN und SAWADA, daß das Einfrieren nicht später als eine Stunde nach der Samengewinnung erfolgen sollte, also nach der Verflüssigung, dem Verdünnen und Adaptieren. Das ist die heute am häufigsten vertretene Vorstellung.

RUBIN und ANDERSSON haben 1969 die Schwangerschaftsraten verglichen, die nach Insemination mit schnell und langsam eingefrorenen Samenproben erreicht wurden. Die besten Ergebnisse wurden mit schnell eingefrorenem Samen gefunden. Dieser Vorstellung widersprachen FRIBERG und GEMZELL.

LAGERUNG

Während zu Beginn der Kryokonservierung, um 1960, das Kryosperma in Dewargefäßen auf Kohlensäureschneepplatten gelagert wurde, hat sich schon sehr kurze Zeit danach die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C durchgesetzt. Dieser Lagerungsmodus ist heute überall gleich. Für die Lagerung interessieren nur noch die minimale und maximale Lagerungsdauer und die Frage, ob bei noch tieferen Temperaturen, etwa der Lagerung im flüssigen Helium bei -272°C , längere Lagerungszeiten mit noch günstigeren Bedingungen erreicht werden können.

In der Humanmedizin gibt es nur sehr wenige Angaben über die Abhängigkeit der Qualität des Kryospermias von der Lagerungsdauer, wenn man als Parameter neben den andrologischen Kriterien auch noch die Befruchtungsraten berücksichtigt. Sicher sind kürzere Lagerungszeiten um wenige Monate günstiger, als eine jahrelange Lagerung. Zumindest über die unzureichende Lagerung bei -79°C äußern sich alle Autoren gleich (FERNANDEZ-CANO, BUNGE, SAWADA). Für die optimale Lagerungsdauer im flüssigen Stickstoff bei -196°C sind Zeiten zwischen 24 Stunden und 18 Monaten ohne wesentliche Reduzierung der Kryospermaqualität angegeben (FRIBERG und GEMZELL, PERLOFF, TYLER, STEINBERGER, SMITH). Abweichend von diesen Angaben ist die Mitteilung von TRELFOED/MUELLER. Sie hatten die besten Überlebensraten bei einem Auftauen mit einer Lagerungsdauer von weniger als 24 Stunden oder von mehr als 5 Wochen. TYLER ist von allen Autoren der größte Optimist: er glaubt, daß eine über 10 Jahre dauerende Lagerung der Samenfäden im flüssigen Stickstoff ohne größeren Schaden von diesen überlebt werden kann.

Für die Bundesrepublik Deutschland wäre eine Zahlenbeispiel interessant. Bei einer Geburtenrate von etwa 500.000 Kindern pro Jahr wäre, falls alle Schwangerschaften durch Insemination zustande kämen, und man für eine Schwangerschaft 4 Inseminationen um den Ovulationstermin an 3 Zyklen rechnet, ein Lagerraum in ca. 4-6 Containern, mit einem Innenraum von 1,50 m x 1,50 m, ausreichend.

AUFTAUEN

Wird der eingefrorene Samen zur Behandlung oder Laboruntersuchung gebraucht, so wird er nach der Herausnahme aus dem Container aufgetaut. Der Auftauvorgang ist abhängig von der umgebenden Temperatur, der Größe der Samenportion und dem Milieu, in dem aufgetaut wird. Der Auftauvorgang erfolgt an der Luft oder im Wasserbad bei unterschiedlichen Temperaturen. MAZUR hat einen engen Zusammenhang zwischen Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit formuliert. Ein schnelles Einfrieren sollte auch ein schnelles Auftauen zur Folge haben. BEHRMAN konnte keine Unterschiede zwischen dem Auftauen bei Raumtemperatur oder im Wasserbad bei 37°C für seine in Ampullen verpackten Samenproben feststellen. BEHRMAN und SAWADA propagierten für das Auftauen der Ampullen das Wasserbad mit 37°C . Die Ampullen wurden darin bis zum Schwinden der letzten Eiskristalle bewegt und anschließend bei Raumtemperatur weiter erwärmt. MATHESON bevorzugt das Auftauen der Pailletten bei Raumtemperatur. Weniger genaue Angaben machte PERLOFF. Er nahm zum Auftauen Leitungswasser.

In einer Arbeit hat HUPFELD unter homogenen Versuchsbedingungen die Motilitätsunterschiede beim Auftauen im Wasserbad oder bei Raumtemperatur von 22°C , 37°C und im Wasserbad bei 52°C mit Herausnahme der Samenproben bei Erreichen von $+ 37^{\circ}\text{C}$ beschrieben. Danach ist der Einfluß der Auftau-temperatur nicht sehr prägnant. Pellets und Pailletten lassen sich aber am günstigsten bei Lufttemperatur von $+ 37^{\circ}\text{C}$ auftauen. Die besten Ergebnisse für die Ampulle erreicht man mit dem Auftauen im Wasserbad bei gleicher Temperatur (Abb.11).

INDIKATION UND THERAPIE

In der Praxis wird das Kryosperma fast ausschließlich zur Insemination benutzt. Die strahlensichere Lagerung eingefrorener Ejakulate als Präventivmaßnahme für die Katastrophensituationen und die experimentellen Untersuchungen im Labor sind bis heute nahezu unbedeutend.

Für die Samenübertragung ergibt die heterologe Insemination wesentlich günstigere Indikationen als die homologe (HILTL und BREGULLA, BREGULLA und SADOWSKI). Dafür wird das Kryosperma stets aufgetaut und mit entsprechenden Instrumenten paracervikal oder intracervikal appliziert. Eine intrauterine Insemination ist aus bestimmten Überlegungen möglich. Sie ist nicht unumstritten, bleibt wohl aber immer ohne ungünstige Nebenwirkungen, soweit mit sauberen Kryosperma gearbeitet wird, und die Volumina 0,2 ml nicht überschreiten. Die Besamung mit dem aufgetauten Ejakulat wird als Warminsemination bezeichnet. Als Kaltinsemination gilt das Einbringen der gefrorenen Samenpellets direkt in den Cervikalkanal oder auf die Portiooberfläche. Mehrere Pellets können auch in einer Portiokappe, die dann entsprechend auf der Portio plaziert wird, eingebracht werden. Verletzungen im Cervikalkanal oder an der Portiooberfläche sind nach der Kälteinsemination nicht bekannt geworden (BREGULLA, persönliche Mitteilung).

Über die Erfolge der Insemination mit Kryosperma gehen die Angaben sehr weit auseinander. SCHAAD (pers. Mitteilung 1972) war bei der heterologen Insemination mit Kryosperma erfolglos. ACKERMAN, BARKAY, BARWIN, BEHRMAN, FJÄLLBRANT, MATHESON, STEINBERGER und SMITH waren dagegen erfolgreich. Alle halten die Befruchtungs-

raten mit Nativsperma für günstiger und geben den Verlust der Fertilisationskapazität beim Kryosperma im Kollektiv mit 25 % an. Rechnet man alle mit Kryosperma bis heute erreichten Schwangerschaften zusammen - die Angaben sind dazu in der Literatur nicht sehr exakt - so dürften aber etwa 10.000 Schwangerschaften erreicht sein. Keiner der behandelnden Ärzte hat für seine Patientinnengruppe über eine auffallende Zahl von Aborten oder mißgebildeten Kindern berichtet. Das läßt die Vermutung zu, daß nach einer gelungenen Insemination mit Kryosperma eine Schwangerschaft wohl nicht wesentlich komplizierter verläuft als nach einer Befruchtung durch Nativsperma.

Insemination mit kryokonservierten oligozoospermen Ejakulaten haben nur wenige versucht. Sie geben Erfolge zwischen 25% und 66% für das Kollektiv der Behandelten an. Dabei ist die Behandlungsdauer ein sicher entscheidender Faktor. Innerhalb der ersten 6 Zyklen wurden die meisten Schwangerschaften beobachtet. Erfolge nach mehr als 12 Zyklen sind sehr selten. Etwa jede 10. Patientin, die erfolglos mit oligozoospermen Samen homolog inseminiert wurde, wird später noch angeblich vom gleichen Partner ohne ärztliche Hilfe schwanger (BREGULLA).

DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Menschliche Samenfäden können in Kälte überleben, diese Tatsache war bereits im 18. Jahrhundert bekannt. Die Entdeckung wurde zwar in den nachfolgenden Jahrhunderten mehrmals bestätigt, aber erst für die Kryokonservierung des menschlichen Samens klinisch brauchbar, nachdem im Jahre 1949 für das Einfrieren als Schutzstoff Glycerin benutzt wurde. Danach gab es in den Jahren zwischen 1963 und 1978 differenzierte Untersuchungen zur Kryokonservierung menschlicher Ejakulate. Sie betrafen überwiegend die Technik der Gefrierkonservierung und seltener die Ergebnisse der Insemination mit dem Kryosperma.

Bei der Verarbeitung der Ejakulate zum Kryosperma sind Verflüssigung, Verdünnung mit dem protektiven Medium, Verpackung, Adaptationszeit, Einfrieren, Lagerung, Auftauen und Applikation des Sperma die wichtigsten Arbeitsschritte. Sie enthalten so viele Variable, daß eine exakte Untersuchung aller Einflüsse bei dem Gefrierverfahren, die die Qualität des Spermas beeinflussen, nicht möglich ist. Damit kann man sicher behaupten, daß es bis heute kein ideales Einfrierverfahren für Humansperma gibt. Berücksichtigt man bei dieser Formulierung aber die Erkenntnis, daß jedes Ejakulat bei der Gefrierung sehr individuell reagiert und selbst hier die optimale Aufarbeitung noch eine Untersuchung notwendig macht, die letztlich das ganze Ejakulat verbraucht, so scheint das Ziel ein ideales Einfrierverfahren für Samenfäden zu finden ein wenig illusorisch.

Trotzdem kann man aber heute doch ganz brauchbare Kryoejakulate erhalten, wenn man nach folgendem Schema vorgeht.

1. Samengewinnung: Ejakulation nach maximaler erotischer Stimulierung bei einer Karenzzeit zwischen 2 und 14 Tagen, Das Auffangen als geteiltes Ejakulat in 2 Portionen ist sinnvoll. Die erste, spermienreiche Portion, wird weiter aufgearbeitet.
2. Verdünnung: Die Verdünnung mit dem protektiven Medium sollte erst nach der Verflüssigung des Samens, die im Durchschnitt nach 20-30 Minuten nach der Ejakulation erreicht ist, erfolgen. Es gibt verschiedene Verdünner. Das Medium von Nagase hat sich am besten bewährt.
3. Verpackung: Der mit dem protektiven Gemisch verdünnte Samen kann in Ampullen, Pailletten oder als Pellet (Nacktpellet, Kapselpellet) abgepackt und eingefroren werden. Aus arbeitstechnischen Gründen und unter Berücksichtigung der Identitätsgarantie hat sich die Paillette durchgesetzt.
4. Einfrieren: Zwei Methoden, das schnelle und langsame Einfrieren, konkurrieren miteinander. Das schnelle Einfrieren

ist in temperaturkonstanten Stickstoffdampfphasen möglich. Der technische Aufwand dafür ist gering. Das Verfahren ist einfach. Die langsame Gefrierung ist als Verfahren mit halb- oder vollautomatischen Gefrieranlagen komplizierter und finanziell aufwendiger. Die Qualität des Kryospermias rechtfertigt aufwendigere Verfahren nur bedingt.

5. Lagerung: Für die Lagerung haben sich mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gefüllte Container durchgesetzt. Der mögliche günstige Effekt noch niedrigerer Lagerungstemperaturen ist noch ungeklärt.
6. Auftauen: Samenportionen in Ampullen, Pailletten oder als Pellet können ohne wesentliche Qualitätsunterschiede bei Raumtemperatur oder im Wasserbad mit $+ 22$ oder $+ 37^{\circ}\text{C}$ aufgetaut werden. Differenziertere Auftauvorgänge mit einem geringen Gewinn an besserer Motilität sind möglich.
7. Insemination
und Erfolge: Heterologe und homologe Insemination mit Kryoejakulaten sind paracervikal, intracervikal und intrauterin möglich. Ampulle und Paillette können mit ihrem Inhalt nur für die Warminsemination benutzt werden. Mit dem

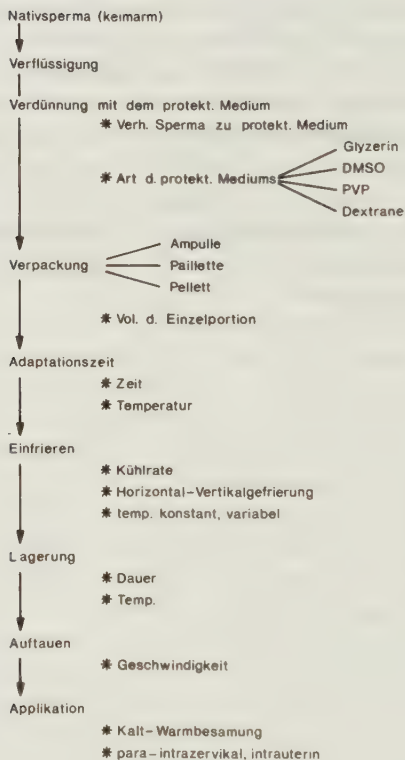
Pellet ist auch eine Kaltinsemination ohne Schaden an der Portio möglich.

Die Erfolge der Sterilitätsbehandlung mit Kryoejakulaten überzeugen nach homologer und heterologer Insemination. Insgesamt werden Befruchtungsraten, wie man sie vom Nativsperma kennt, nicht erreicht. Die Minderung der Befruchtungsraten wird aber bedingt ausgeglichen durch Vorteile, die man mit den Kryoejakulaten besitzt, etwa der zeitlichen Unabhängigkeit und Möglichkeit der Sortierung nach genetischen Merkmalen.

Abb. 1

HERSTELLUNG DES KRYOSPERMAS

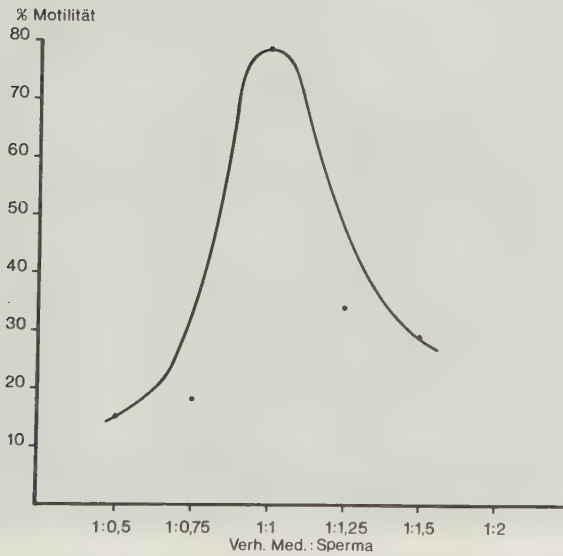
Herstellung des Kryospermas



Die einzelnen Stufen der Herstellung des Gefrier-samens sind durch die Pfeilrichtung angegeben. Die be-kannten Variablen, die die Qualität des Kryospermas beeinflussen können, sind durch eine sternförmige Figur gekennzeichnet.

Abb. 2

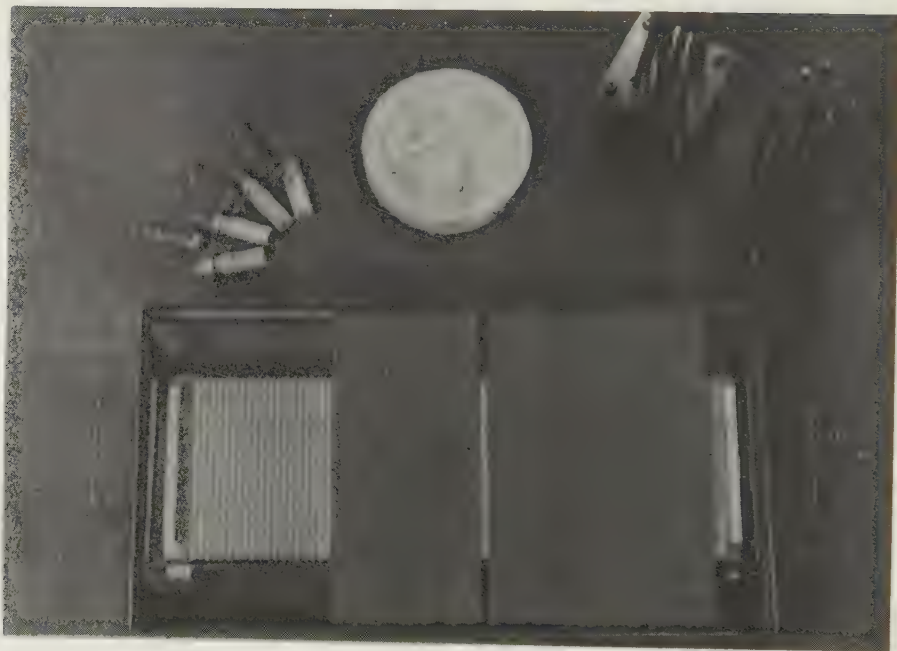
ABHÄNGIGKEIT DER QUALITÄT DES KRYOSPERMAS VOM VER-
HÄLTNIS MEDIUM ZU SPERMA



Die Qualität des Gefriersamens ist bei dem getesteten Verdünner am günstigsten wenn im Verhältnis 1:1 zuge-
mischt wird.

Abb. 3

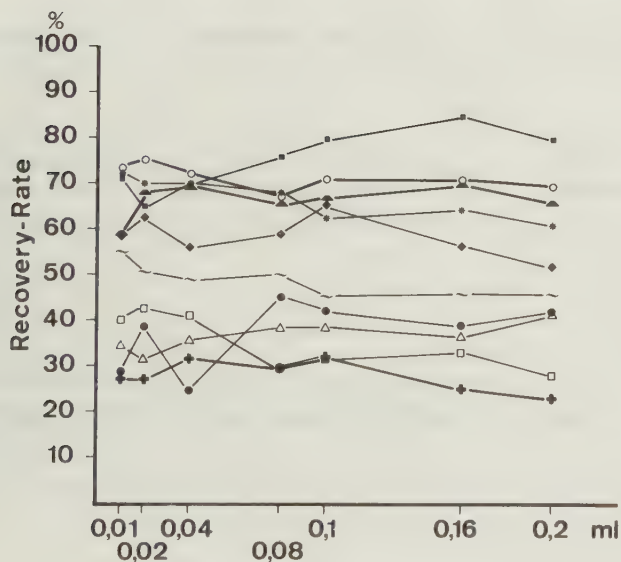
VERPACKUNGSARTEN DES KRYOSPERMAS



Samenportionen können zur Gefrierung in Ampullen, Pailletten (Kunststoffröhrchen) oder als Pellet (Samentropfen) abgefüllt oder verpackt werden. Die abgebildeten Pellets sind Nacktpellets.

Abb. 4

ABHÄNGIGKEIT DER KRYOSPERMAQUALITÄT VON DER GRÖSSE DER
NACKTPELLET



Bei einem Pelletvolumen zwischen 0,1 und 0,2 ml ist die Qualität des Pellet-Kryosperma nicht abhängig von der Größe des Pelletvolumen. Dieses Verhalten ist bis zu einer Größe von 1 ml identisch. Größere Portionen bedeuten eine Qualitätsminderung.

Abb. 5

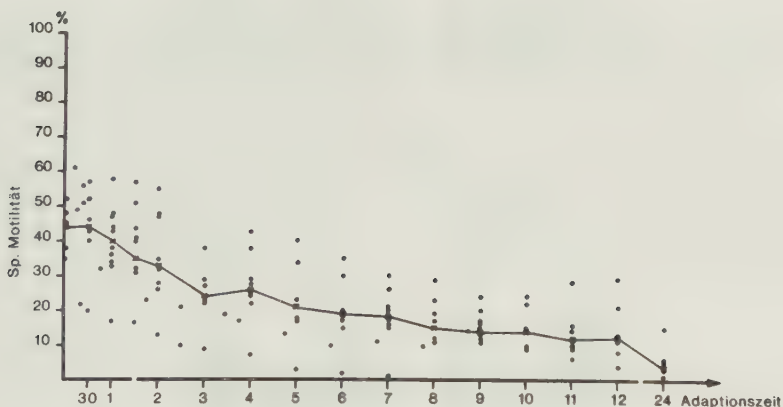
ANZAHL DER ABRIEBSPERMIEN ABHÄNGIG VOM UMFANG DER
ERSCHÜTTERUNGEN IM LAGERBEHÄLTER

SCHÜTTELZEIT	NICHT ZENTRIFUGIERTES MEDIUM	ZENTRIFUGIERTES MEDIUM
1/2 Stunde	0 Spermien/ml	400 Spermien/ml
1 Stunde	0 Spermien/ml	400 Spermien/ml
2 Stunden	400 Spermien/ml	1.200 Spermien/ml

Die Anzahl der Spermien oder der Spermienfragmente nimmt mit der Anzahl der Erschütterungen, die den Lagercontainer treffen, zu.

Abb. 6

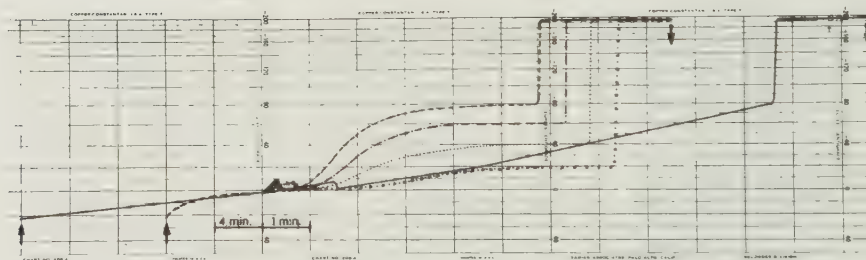
ANHÄNGIGKEIT DER QUALITÄT DES KRYOSPERMAS VON DER
ADAPTATIONSZEIT



Adaptationszeiten bis zu 30 Minuten waren für aller untersuchten Ejakulate günstig. Länger dauernde Zeiten gingen mit einer kontinuierlichen Minderung der Samenqualität einher.

Abb. 7

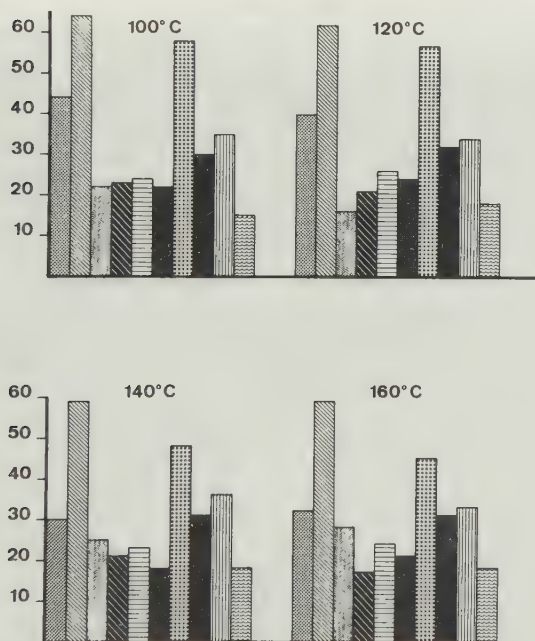
TEMPERATURKURVEN DER EJAKULATPORTIONEN BEIM EINFRIEREN
IN TEMPERATURKONSTANTEN STICKSTOFFDAMPFPHASEN UND BEI
HALBAUTOMATISCHER STEUERUNG UNTER BERÜCKSICHTIGUNG VON
ZEIT UND TEMPERATUR



Die aufgezeichneten Temperaturkurven sind im Bereich von $+22^{\circ}\text{C}$ - 0°C gerafft. Die durchgezogene Linie stellt den Verlauf beim langsamen Einfrieren, nach dem Verfahren von BEHRMAN und SAWADA dar. Die anderen unterbrochenen Linien entsprechen den Temperaturverläufen beim Abkühlen der Samenportionen im Eisschrank auf $+2^{\circ}\text{C}$ mit nachfolgendem Eintauchen in Stickstoffdampfphasen von -20°C , -40°C , -60°C und -80°C . An ihrem Ende sind die im Stickstoffdampf aufgezeichneten Temperaturkurven für eine bessere Übersicht auseinandergezogen. Der steile Abfall aller Kurven erklärt sich mit dem Umsetzen in flüssigen Stickstoff (-196°C).

Abb. 8

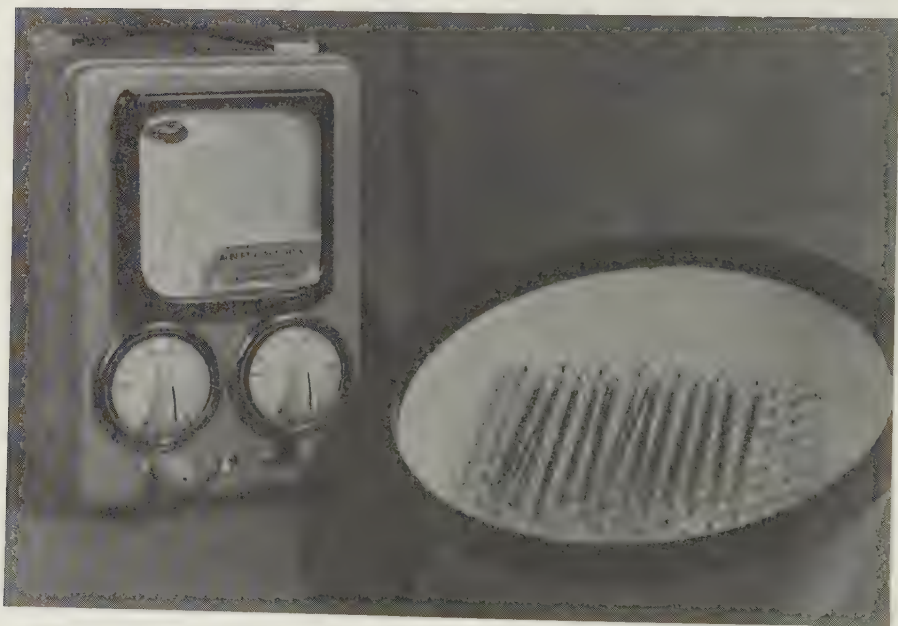
ABHÄNGIGKEIT DER QUALITÄT DES KRYOSPERMAS VOM EINFRIEREN
DER SAMENPROBEN IN TEMPERATURKONSTANTEN STICKSTOFF-
DÄMPFFPHASEN ZWISCHEN -100 und -160°C



Beim Einfrieren in temperaturkonstanten Stickstoffdampfphasen verhalten sich die einzelnen Ejakulatportionen im geprüften Bereich zwischen -100°C und -160°C weitgehend gleich. Eine Signifikanz für einen Temperaturbereich, der für alle Ejakulatproben zutrifft, läßt sich nicht errechnen.

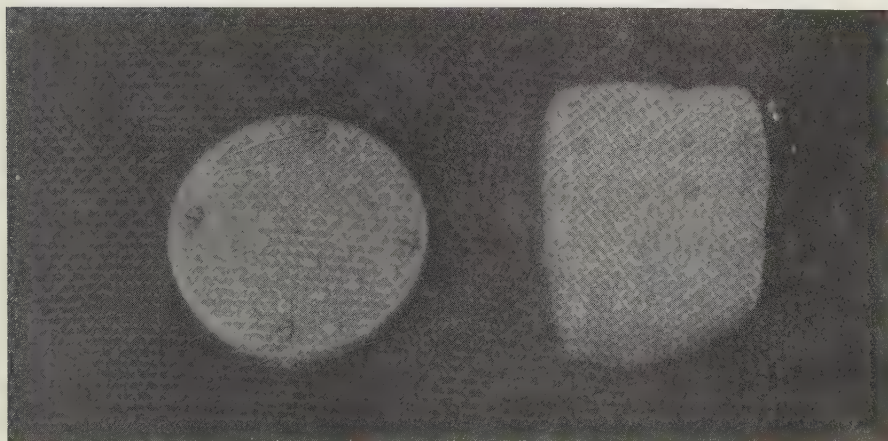
Abb. 9

TIEFKÜHLKONSERVIERUNG DES MENSCHLICHEN SPERMAS IM VERTIKAL-
UND HORIZONTALVERFAHREN



Zum Einfrieren nach dem Horizontalverfahren liegen die Pailletten auf dem Gitter im Stickstoffdampf bei -80°C . Die Temperatur läßt sich mit einem einfachen Thermometer messen. Zusätzlich registriert ein Thermoelement in einer Paillette die Abkühlung und überträgt sie dem Temperaturschreiber.

PELLETHERSTELLUNG AUF EINER ABGEKÜHLTEN METALLPLATTE
UND IM TROCKENEISBLOCK



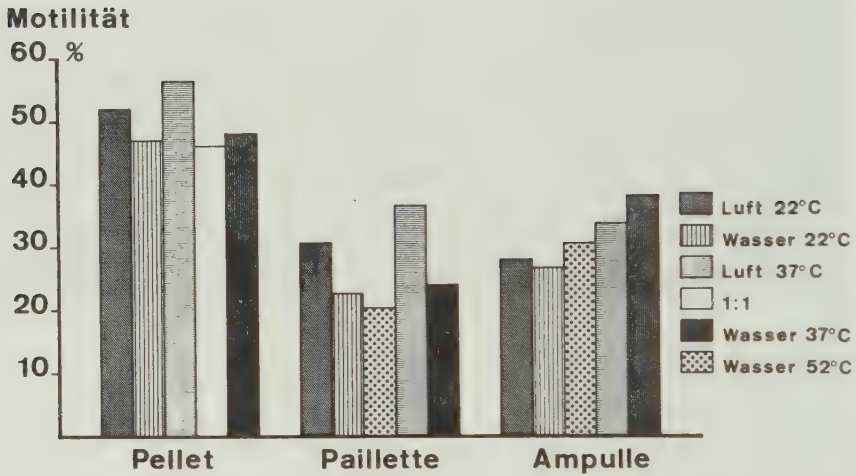
Das im Trockeneis gefrorene Kryosperma ist nach dem Auftauen, soweit es die Motilität betrifft, besser, als beim Gefrieren auf einer abgekühlten Metallplatte. Unterschiedliche Einfriertemperaturen gleichen die errechneten Unterschiede nicht aus.

MOTILITÄTSVERHALTEN DER SAMENPELLETS DIE AUF ABGEKÜHLTEN
METALLPLATTEN ODER IM TROCKENEISBLOCK GEFOREN WERDEN

Trockeneis	Metallplatte			
	-20°C	-40°C	-80°C	-120°C
-80°C 31,8%	14,6%	16,3%	12,9%	8,8%

Abb. 11

ABHÄNGIGKEIT DER MOTILITÄT DER EJAKULATE VON DER AUFTAU-
TEMPERATUR UND IHRER VERPACKUNGSART



Der Einfluß der unterschiedlichen Auftaubedingungen ist gering. Pellets und Pailletten lassen sich am günstigsten bei Lufttemperatur von + 37°C auftauen. Für die Ampulle ist das Auftauen im Wasserbad bei + 37°C besser.

LITERATURÜBERSICHT

- 1 Ackerman, D. R. Glycerol Metabolism in
Untreated, Cold-Shocked, and
Frozen Human Spermatozoa.
Cryobiology 7, 145-147 (1970)

- 2 Amelar, R.D., The Split Ejaculate. Its Use
R.S. Hotchkiss in the Management of Male
Infertility.
Fertil Steril. 16, 46-60 (1965)

- 3 Aplas, M.M.R. Untersuchungen zur Tiefkühl-
konservierung menschlicher Eja-
kulate in Pellet-Form. Inwie-
weit beeinflusst die Pellet-
Grösse die Qualität des Kryo-
spermas.
Dissertation Erlangen 1976.

- 4 Barkay, J., A new, practical method of
H. Zuckerman, freezing and storing human sperm
M. Heiman and a preliminary report on its
use.
Fertil. Steril. 25, 399-406 (1974)

- 5 Barwin, B. N. Intrauterine Insemination of
Husband's Semen.
J. Reprod.Fertil. 36, 101-106 (1974)

- 6 Beck, W. W. Jr. Arteficial Insemination and Semen
Preservation.
Clin. Obstet. Gynec.17, 115-125
1974

- 7 Beck, W. W. Jr.,
I. Silverstein
Variable Motility Recovery of
Spermatozoa
Following Freeze Preservation
Fertil. Steril. 26, 863-867 (1975)

- 8 Behrmann, S.J.,
D.R. Ackerman
Freeze preservation of human sperm.
Amer. J. Obstet. Gynec. 103, 654-
664, (1969)

- 9 Behrman, S.J.,
Y. Sawada
Heterologous and Homologous Insem.
with Human Semen Frozen and Stored
in a Liquid-Nitrogen Refrigerator.
Fertil.Steril.17, 457-466 (1966)

- 10 Bodenstein, J.
Untersuchungen zur Spermazentrifugation
und anschliessender Kryoaufbereitung.
Dissertation Erlangen 1974.

- 11 Boström, K.,
S.-O. Rubin
Destruction of Spermatozoa in
Freeze-Thawing of Human Semen.
Scand.J.Urol.Nephrol. 7,
120-122 (1973)

- 12 Bregulla, K.,
U.M. Boquoi
Untersuchungen zur Tiefkühlkonser-
vierung des menschlichen Spermas.
Arch. Gynäk. 212, 323-332 (1972)

- 13 Bregulla, K.,
R. Sadowski
Die Insemination. Indikation, Technik,
Ergebnisse.
Geburtsh.u.Frauenhk. 32,
802-813 (1972)

- 14 Bregulla, K.,
P. Hiltl
Homologe Insemination mit TG-N₂
oligozoospermen Ejakulaten.
Jahrestagg. Dtsch.Ges. zum Studium
der Fertilität und Sterilität am
15.4.1973)

- 15 Bregulla, K.,
G. Staeps,
R. Hahn,
P. Hiltl
,
Die Abhängigkeit der Spermien-
motilität bei der Tiefkühlkonser-
vierung von der Art der Abfüll-
technik und Verpackung.
Z. Hautkr. 49, 25-29 (1973)

- 16 Broesike, G.
Über die Entleerung und Beschaffen-
heit der menschlichen Samenflüssig-
keit.
Arch. mikrosk. Anat. 78, 128-150
(1911)

- 17 Bunge, R.G.
Some Observations on the Male
Ejaculate.
Fertil. Steril. 21, 639-644 (1970)

- 18 Bunge, R.G.,
W.C. Keettel
Clinical Use of Frozen Semen.
Fertil. Steril. 6, 520-529 (1954)

- 19 Bunge, R.G.,
J.K. Sherman
Fertilizing Capacity of Frozen Human
Spermatozoa.
Nature 172, 767-768 (1952)

- 20 Bunge, R.G.,
J.K. Sherman
Frozen Human Semen.
Fertil. Steril. 5, 193-194 (1954)

- 21 Burks, J.L. und
Mitarbeiter
Morphologic Evaluation of Frozen
Rabbit and Human Ova. Fertil. Steril.
16, 638 (1965)

- 22 Cassou, R.
Die Miniaturisierung der Pailletten.
Intern. Kongr. Tier. Fortpflanzung
und künstl. Besamung, Paris 1968

- 23 David, G.
F. Czyglik
Tolérance à la congélation du sperme
humain en fonction de la qualité
initiale du sperme.
J. Gyn. Obst. Biol. Repr. 6, 601-610
(1977)

- | | | |
|-----|---|---|
| -24 | Eliasson R.,
Lindholmer C. | Zinc in human seminal plasma.
Andrologie 3, 147 (1971) |
| -25 | Eliasson, R. | Standards for investigation of
human semen.
Andrologia 3, 49-64 (1971) |
| -26 | Eliasson, R.,
L. Treichl | Supravital staining of human
spermatozoa.
Fertil. Steril.22, 134-137(1971) |
| -27 | Emran
Rajab-Ali | Untersuchungen zur Qualität
des Pellet-Kryospermas
Dissertation Erlangen 1977 |
| -28 | Fernandes-Cano,L.,
M.F. Menkin,
C.-R. Garcia
J. Rock | Refrigerant Preservation of
Human Spermatozoa.
Fertil.Steril.15, 390-406(1964) |
| -29 | Fjällbrant, B.,
D.R. Ackermann | Cervical Mucus Penetration in
Vitro by Fresh and Frozen-Preserved
Human Semen Specimens.
J. Reprod. Fertil.20, 515-517(1969) |
| -30 | Friberg, J.,
C. Gemzell | Sperm-freezing and Donor Insemination
Int. J. Fertil.22, 148-154 (1977) |
| -31 | Friberg, J.,
C. Gemzell | Inseminations of human sperm after
freezing in liquid nitrogen vapors
with glycerol or glycerol-egg-yolk-
citrate as protective media.
Amer. J. Obstet. Gynec. 116,
330-334 (1973) |
| -32 | Harpantidou, S. | Ein Vergleich der Verdünner von
Behrman-Sawada, Nagase und Carlborg
für die Kryokonservierung menschlicher
Ejakulate in Pelletform.
Dissertation Erlangen 1976 |

- 33 Harvey, C.,
M.H. Jackson A Method of Concentrating
Spermatozoa in Human Semen.
J. clin. Path.8, 341-342(1955)

- 34 Hupfeld, M. Untersuchungen zur Abhängigkeit
der Spermienmotilität bei der
Tiefkühlkonservierung von der Ver-
packungsart und der Auftaumethode.
Dissertation Erlangen 1976.

- 35 Jahnel, F. Über die Widerstandsfähigkeit von
menschlichen Spermatozoen gegen-
über starker Kälte.
Klin. Wschr. 17, 1273-1274(1938)

- 36 Lindholmer, Ch.,
R. Eliasson The Effects of Albumin, Magnesium,
and Zinc on Human Sperm Survival
in Different Fractions of Split
Ejakulates.
Fertil.Steril.25, 424-431 (1974)

- 37 MacLeod, J.,
R.S. Hotchkiss The Distribution of Spermatozoa and
of Certain Chemical Constituents
in the Human Ejaculate.
J. Urol. 48, 225-229 (1942)

- 38 Mahner, J.A.K. Der Einfluss verschiedener protekt.
Substanzen auf die Qualität des
menschlichen Kryospermas.
Dissertation Erlangen 1976.

- 39 Mantegazza, J. Fisilogia sullo Sperma umano
Rendic. Reale Instit. Lomb. 3-183
(1866)

- 40 Matheson, G.W.,
L. Carlborg,
C. Gemzell Frozen human semen for artificial
insemination.
Amer.J.Obstet. Gynec. 104,
495-501 (1969)

- 41 Mazur, P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells.
Cryobiology 2, 181-192, (1966)

- 42 Nagase, H,
Graham, E.F.
1964 Pelleted Semen: Comparison of different extenders and processes on fertility of Bouinespermatozoa V. Int. Congr. Anim.Reprod of A.I. Trento 4, 387

- 43 Perloff, W.H.,
E. Steinberger
J. Sherman Conception with Human Spermatozoa Frozen by Nitrogen Vapor Technic. Fertil.Steril. 15, 501-504 (1964)

- 44 Piasecka-Serafin, Bacteria translocalisation in pelleted S.Wierzbowski semen by liquid nitrogen.
Fortpfl. Haust.6, 365-368 (1970)

- 45 Polge, C.,
A.U. Smith
A.S. Parkes Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures.
Nature 164, 666 (1949)

- 46 Rostand, I. C.R. Acad.Sci. (Paris) 222-1524, (1946)

- 47 Rubin, S.-O.,
L. Andersson,
K. Boström Deep-Freeze Preservation of Normal and Pathologic Human Semen.
Scand.J.Urol.Nephrol.3, 144-150 (1969)

- 48 Rudofsky, R. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Spermienmotilität bei der Tiefkühlkonservierung von der Adaptionszeit und zum Problem des Abriebspermas.
Dissertation Erlangen 1976.

- 49 Sawada, Y. The Preservation of Human Semen by Deep Freezing.
Int. J. Fertil.9, 525-532 (1964)

- 50 Sawada, Y., Motility and Respiration of
 D. Ackerman, Human Spermatozoa after
 S.J. Behrman Cooling to Various Low
 Temperatures.
 Fertil.Steril.18, 775-781,
 (1967)

- 51 Sherman, J.K. Questionable Protection by
 Intracellular Glycerol During
 Freezing and Thawing.
 C. Cell.Comp. Physiol. 61,
 67-83 (1963)

- 52 Sherman, J.K. Improved Methods of Preservation
 of Human Spermatozoa by
 Freezing and Freeze-Drying.
 Fertil.Steril.14, 49-64 (1963)

- 53 Sherman, J.K. Low Temperature Research on
 Spermatozoa and Eggs.
 Cryobiology1, 103-129 (1964)

- 54 Sherman, J.K. Research on Frozen Human Semen.
 Past,Present, and Future.
 Fertil.Steril.15, 485-500 (1964)

- 55 Sherman, J.K. Synopsis of the Use of Frozen
 Human Semen.
 Since 1964: State of the Art of
 Human Semen Banking.
 Fertil.Steril.24, 397-412 (1973)

- 56 Sherman, J.K., Importance of Frozen-Stored
 J. Rosenfeld Human Semen in the Spread of
 Gonorrhoea.
 Fertil.Steril. 26, 1043-1047
 (1975)

- | | | |
|-----|----------------------------------|--|
| -57 | Smith, K.D.,
E. Steinberger | Survival of Spermatozoa in a
Human Sperm Bank.
J. Amer.Med. Ass. 223,
774-777 (1973) |
| -58 | Spallanzani, L | Opuscoli di fisca animale, e
vegetabile opusculi II
Osservazione, e sperienze intorno
ai vermicelli spermatici
dell'uomo e degli animazi
Mondena 1776 |
| -59 | Steinberger, E.,
W.H. Perloff | Preliminary experience with
a human Sperma bank.
Amer. J. Obstet. Gynec. 92,
577-579 (1965) |
| -60 | Steinberger, E.,
K.D. Smith | Artificial Insemination with
Fresh or Frozen Semen.
J.Amer.Med. Ass. 223,
778-783 (1973) |
| -61 | Steptoe, P.,
Edwards, R. | Meldung in Daily Mail vom
26.7.1978. |
| -62 | Trelford, J.D.,
F. Mueller | Observations and Studies on
the Storage of Human Sperm.
Canad.Med.Ass.J. 100,
62-65 (1969) |
| -63 | Tyler, C.W.,
G.S. Berger | Cryobanking of Semen (Cont.).
New Engl.J.Med. 288, 527 (1973) |
| -64 | Tyler, E.T. | The Clinical Use of Frozen Semen
Banks.
Fertil.Steril.24, 413-416 (1973) |
| -65 | Vasterling, HW | Die künstliche Besamung beim
Menschen
In:Künstliche Besamung und Ei-
transplantation bei Tier und Mensch
Herausgeg.v.S.K.Pfaufner 1974 |

BIOGRAPHISCHE DATEN

geboren: 17. November 1940 in Roedoe/Norwegen
Vater: Olav J. Aga. Arzt
Mutter: Johanne Marie Aga

Schule: 1947 bis 1954 Volksschule in Frekhaug
bei Bergen/Norwegen

1954 bis 1959 Bergen Katedralskole,
Bergen/Norwegen

Studium
und 1959 bis 1965 Medizin. Universität,
Freiburg/Breisgau.
Examina: Deutsches Staatsexamen
Dez. 1965

Norwegische ärztliche
Prüfung an der Universität
Oslo im Juni 1966

Medizinal- Jan. bis Juni 1966 Psychiatrisches Krankenhaus
assistenten- Dikemark bei Oslo/Norwegen
zeit:

Juli bis Dez. 1966 Chirurgische Abteilung des
Kreiskrankenhauses Lahr/
Schwarzwald.

Jan. bis Juni 1967 Innere Abteilung des Kreis-
krankenhauses Orkdal/Norwegen

Juli bis Dez. 1967 Tätigkeit beim Kreisarzt
Dr. Jon Kronberg in Ørsta/Nor-
wegen

Approbation: Februar 1968 als norwegischer Arzt

Tätigkeit

nach der

Approbation: März bis Dez. 1968

Praktischer Arzt
in Vingaaker/Schweden

Nov.1969 bis Jan.1971

Assistenzarzt an der
chir. Abteilung des
Kreiskrankenhauses
Kronach/Oberfranken

Jan.1971 bis Jan.1976

Qualifizierung als
amerik. Arzt mit nach-
folgender Tätigkeit als
Allgemeinpraktiker in
Green Bank/West Virginia/USA

Febr.1976 bis Dez.1978

Assistenzarzt, gyn./ge-
burtshilfliche und An-
ästhesieabteilung, Kreis-
krankenhaus Lichtenfels/
Obfr.

Jan. 1979 bis z.Zt.

Assistenzarzt gyn./ge-
burtshilfliche Abteilung,
Kreiskrankenhaus Kronach.

Militär:

Jan. bis Febr. 1968

Grundausbildung als
Sanitätsoffizier des nor-
weg. Heeres, Lahaugmoen
bei Oslo.

Nov.1968 bis Nov.1969

Dienst als Sanitätsoffizier
in Heistadmoen/Norwegen.

